

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 01-249717

(43)Date of publication of application : 05.10.1989

(51)Int.Cl.

A61K 9/10
C07D251/46

(21)Application number : 63-076862

(71)Applicant : FUJI PHOTO FILM CO LTD

(22)Date of filing : 30.03.1988

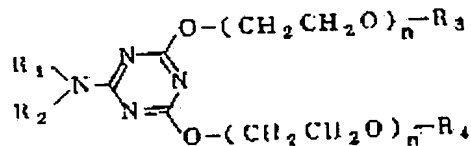
(72)Inventor : ONO MITSUNORI

(54) PRODUCTION OF LIPOSOME

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain stable liposome with a slight leakage of including drug, by using polyethylene glycol derivative and lipid.

CONSTITUTION: 2,4-bis(polyethylene glycol)-6-amino-S-triazine derivative expressed by the formula (n is 6-200; R₁ and R₂ is H, alkyl, alkylcarbonyl or alkylsulfonyl; R₃ and R₄ is H or methyl; with the proviso that amino group is not amino residue included in enzyme or protein) and phospholipid (e.g., egg yolk lecithin) are prepared by conventional liposome forming method to afford the aimed substance. Active PEG2 made in SEIKAGAKU KOGYO KK is reacted with amine in toluene solvent in the presence of Na₂CO₃ at room temperature to afford the compound expressed by the formula.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平1-249717

⑬ Int. Cl.⁴

A 61 K 9/10
C 07 D 251/46

識別記号

3 2 7

庁内整理番号

F-7417-4C
7822-4C

⑭ 公開 平成1年(1989)10月5日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 リボソームの製造方法

⑯ 特 願 昭63-76862

⑰ 出 願 昭63(1988)3月30日

⑱ 発 明 者 小 野 光 則 神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真フイルム株式会社内

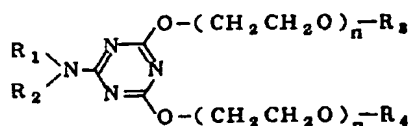
⑲ 出 願 人 富士写真フイルム株式会社 神奈川県南足柄市中沼210番地

明 細 書

1. 発明の名称 リボソームの製造方法

2. 特許請求の範囲

式〔1〕で表わされる2,4-ビス(ポリエチレングリコール)-6-アミノ-5-トリアジン誘導体と脂質を用いることを特徴とするリボソームの製造方法。



式中、nは、6～200の整数を表わし、R₁、R₂は水素原子、アルキル基、アルキルカルボニル基、アルキルスルホニル基を表わす。R₃、R₄は水素原子又はメチル基を表わす。ただし、式1のアミノ基は酵素、あるいは蛋白質に含まれるアミノ残基を意味しない。

3. 発明の詳細な説明

(発明の分野)

本発明は安定なリボソームの製造に有用な2,4-ビス(ポリエチレングリコール)-6-置換-5-トリアジン誘導体に関する。

(従来の技術)

リボソームは、通常水性物質により相互に一定の間隔を保つた多数のリン脂質二層からなる(小胞といわれる)ことが知られている。かようなリボソームを薬剤の運搬体として応用しようとする試みが多数報告されている。(例えばG. Gregoriadis, New Engl. J. Med., 295, 765(1976))

しかし薬剤の運搬体として利用するに際し、大きな欠点が指摘されてきた。即ち、非共有結合性相互作用による分子集合体であるという宿命ゆえの構造的不安定性、薬剤のもれ現象である。従来、この点を改良する目的で、たとえば多量で被覆したリボソームの製法(特開昭61-69801号)や水素結合によつて構造強化されたリン脂質(日本化学会誌 569頁 1987年)が開発され

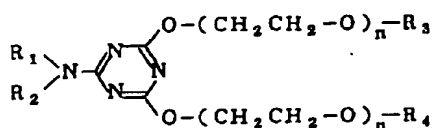
ている。しかし未だ充分とは言いがたく新しい方法の開発が強く望まれているのである。

(発明の目的)

本発明の目的は、内包する薬物のもれが少ない安定なリポソームの製造法を提供することである。

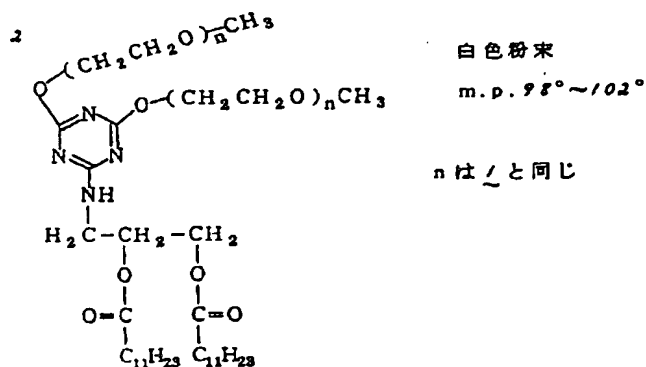
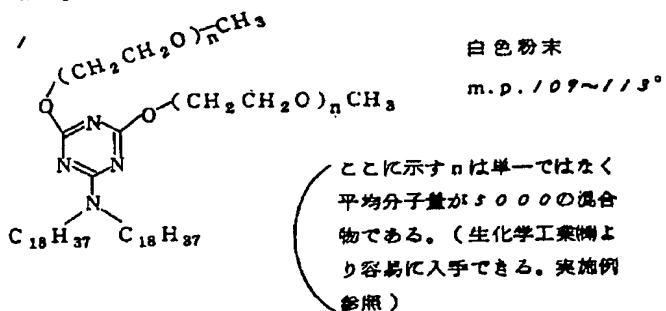
(発明の構成)

本発明は、リポソーム膜を、脂質および式Ⅰで示されるⅡ、Ⅳ-ビス(ポリエチレングリコール)-Ⅵ-置換アミノ-Ⅴ-トリアジン誘導体より構成することを特徴とするリポソーム膜の製造方法に関する。



式Ⅰにおいて、 n は3~200の整数を表わす。好ましくは8~200であり混合物であつてもよい。混合物の場合のポリエチレングリコール部の平均分子量は350~5000が望ましい。

次に式Ⅰで示される化合物の具体例を列挙するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。



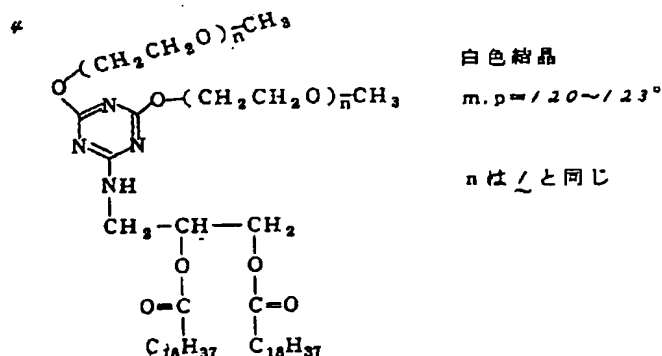
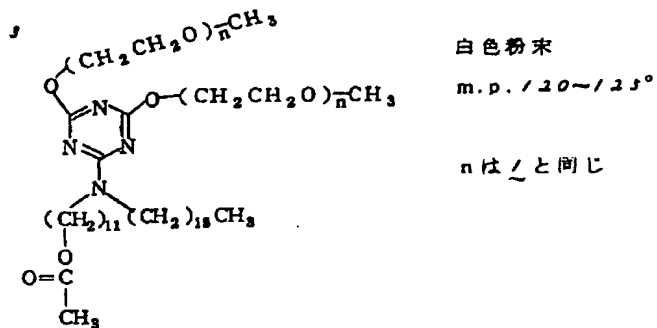
式中 R_1 、 R_2 は水素原子、アルキル基、アルキルカルボニル基、アルキルスルホニル基を表わす。

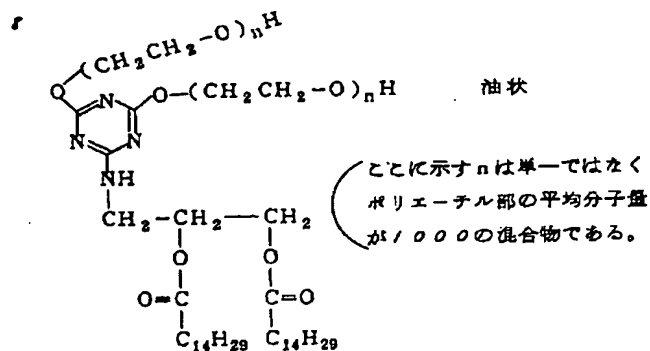
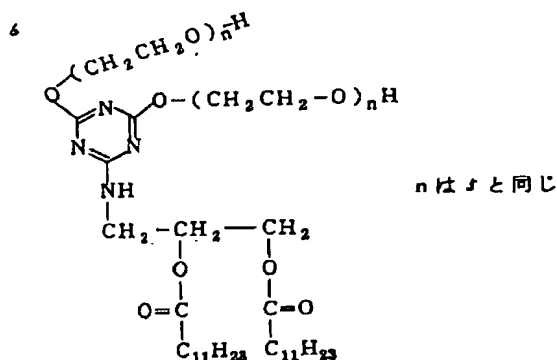
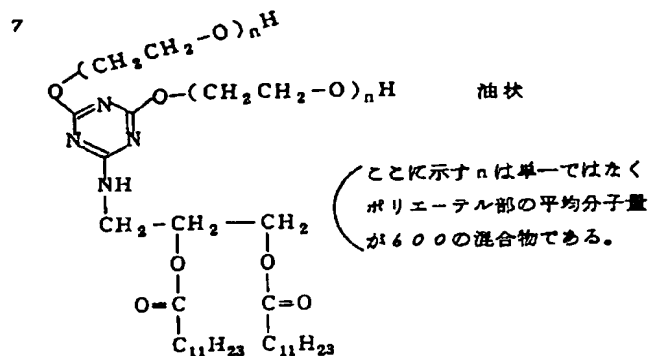
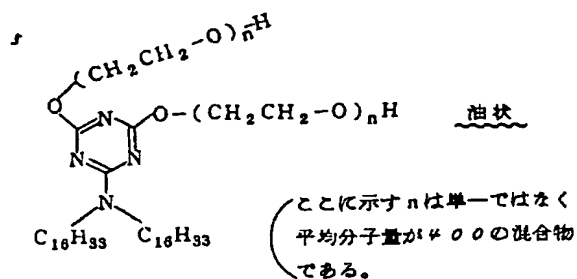
アルキル基の場合、直鎖でも分枝状でもよい。アルキル基上には置換基を有していてもよく、置換基としてはアルキルカルボキシ基、アルキルカルバモイル基、アルキルチオ基、アルコキシ基の中から選ばれる。 R_1 、 R_2 がアルキル基を表わす場合、望ましくは炭素数が8~30ケのものである。

R_1 、 R_2 がアルキルカルボニル基を表わす場合その炭素数は望ましくは8~30ケのものである。そのアルキル基は直鎖、分枝状いずれでもよく前記のような置換基を有していてもよい。

R_1 、 R_2 がアルキルスルホニル基を表わす場合、その炭素数は、望ましくは8~30ケのものである。そのアルキル基直鎖、分枝状いずれでもよく、前記のような置換基を有していてもよい。

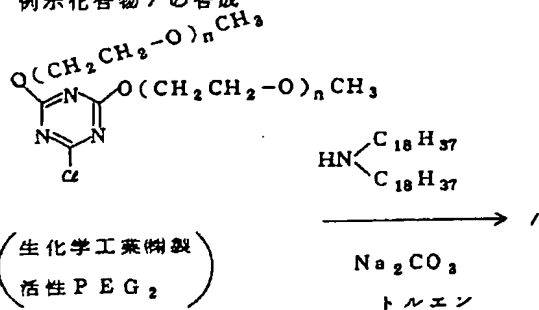
式Ⅰにおいて R_3 、 R_4 は水素原子又はメチル基を表わす。





合成例

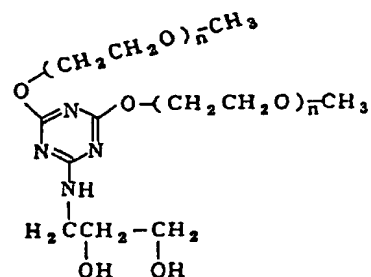
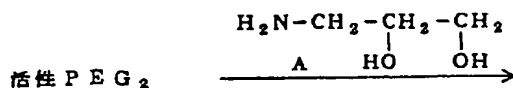
例示化合物1の合成



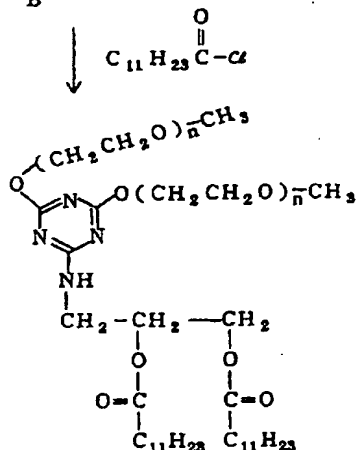
トルエン30ml中に(Na_2CO_3 1.0g)とアミン体1gを入れ室温下かくはんした。その中に、生化学工業特許活性PEG₂ 1gを入れ室温で2時間反応させた。伊過硫酸後水を5ml加え不溶物を伊別し、伊液をセファロース4Bカラムにかける。(500ml)水にて溶離し、10mlづつのFractionにわけFraction18~28の液を凍結乾燥すると目的の1が白色粉末として得られた。0.8g。

構造はNMRにより確認した。

例示化合物2の合成



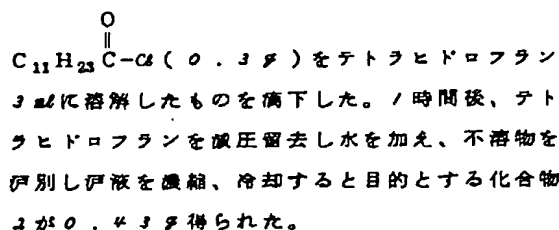
B



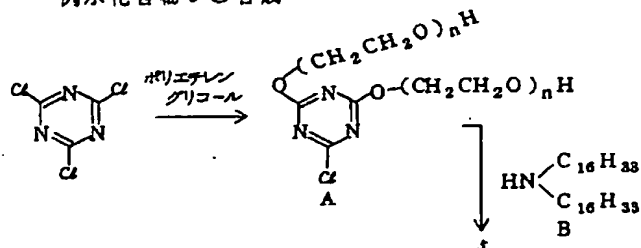
2

テトラヒドロフラン30mlの中にAを2g入れ、室温でかくはんした。その中に活性化PEG₂を1g入れ室温で2時間かくはんした。例示化合物1の合成の分離条件と同様にセファロース4Bによるゲル透過を行いBを0.7g得た。

化合物B0.5gを無水テトラヒドロフランに溶解しトリエチルアミンを2ml加える。その中に



例示化合物3の合成



ポリエチレングリコール(平均分子量400; 和光純薬製)80gを無水テトラヒドロフラン300mlに加え冷却下、NaH(60%分散物)8.0gを徐々に加え、室温に戻して1時間かくはんした。

その混合物の中にトリクロロトリアジン18.4g加え室温で2時間かくはんしその後油温60°で1時間かくはんした。テトラヒドロフランを減圧留去後クロロホルムに再溶解しシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製すると(シリカゲル3R; 溶離液クロロホルム)目的とする化合物Aが53g油状物として得られた。

アミン体B4.7gとトリエチルアミン2gをテトラヒドロフラン50mlに溶解した。その中に化合物Aを9.1g加え室温で5時間かくはんした。テトラヒドロフランを減圧留去して残渣を、クロロホルムに再溶解しカラムクロマトグラフィーにより分離精製すると(シリカゲル400g; 溶離液クロロホルム)目的とする3が7.1g得られた。

リポソームを形成させるために用いるリン脂質としては、卵黄、大豆あるいはその他の動・植物に由来するホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリンや、合成によつて得られるジパルミトイルレシチン、ジステアロイルレシチン、ジミリスチルレシチン等を挙げることができる。

次にリポソームに取りこませる親水性薬物としては例えばアドリアマイシン、アクテノマイシン、マイトマイシン、 $1-\beta$ -アラビノフラシルシトシン、ブレオマイシン、シスプラチン等の抗がん剤、インターフェロン等の抗ウイルス剤、アミノ配糖体(例えば、ゲンタマイシン)、 β -ラクタム系(例えばスルペニシリン、セフトリアム、セフメノキシム)等の抗生物質、TRH、リヌウプロライド、インスリン等のペプチドホルモン剤、リゾチーム、アスパラギナーゼ、グリコシダーゼ等の酵素剤、ムラミルジペプチド、ムラミルトリペプチド等の免疫賦活剤、イムノグロブリン、各種ト

キシニン等の蛋白質が挙げられる。

本発明に係るリポソーム製剤中の式ノで表わされる化合物の配合量は特に限定はないが、好ましくは、リポソームを形成し得る複合リン脂質ノに対し0.1~1.0(重量比)の配合比である。

またステロール等の添加物を混合してもよい(例えば、コレステロール、 β -シトステロール、ステグマステロール、カンベステロールなど)。

式ノで表わされる化合物とリン脂質を用いてリポソームを形成させるには通常のリポソーム形成法すなわちボルテクスイング法[A. D. Bangham, J. Mol. Biol., 13, 238(1965)], ソニケーション法(C. Huang, Biochem., 8, 344(1969)], プレベシクル法[H. Trauble, Neurosci. Res. Prog. Bull., 2, 273(1971)], エタノール注入法[S. Batzri, Biochem. Biophys. Acta., 298, 1013(1973)], フレンテプレス押出法[Y. Barenholz, FEBS. Lett., 92, 210(1979)], コール

酸除去法[Y. Kagawa, J. Biol. Chem., 246, 5477(1971)], トリトンX-100パッチ法[W. J. Gerritsen, Eur. J. Biochem., 55, 255(1975)], Ca^{2+} 融合法[D. Papahadjopoulos, Biochem. Biophys. Acta. 394, 483(1975)], エーテル注入法[D. Deamer, Biochem. Biophys. Acta., 443, 629(1976)], アニールグ法[R. Lawaczeck, Biochem. Biophys. Acta, 443, 313(1976)], 凍結融解融合法[M. Kasahara, J. Biol. Chem., 252, 7384(1977)], W/O/Wエマルジョン法[S. Matsumoto, J. Colloid Interface Sci., 62, 149(1977)], 逆相蒸発法[F. Szoka, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 4194(1978)]など多くの方法が知られているが、本発明では上記いずれの調製法を用いてもよくまたこれらに限定されるものではない。

(発明の効果)

本発明の化合物は、脂質を水中に分散させた時に形成されるリポソームの内包物のもれを少なくするのに有効な化合物である。すなわち式ノで表わされるポリエチレングリコール誘導体をリン脂質と混合することによりリポソームの表面がポリエーテル被覆され、リポソーム内から内包物のもれが少なくなる。式ノで表わされる化合物は、クラウンエーテルの基本構造を有しており、生体内の豊富な Na^+ 、 K^+ を取りこみ表面を強固に保護する。また表面に強い荷電を発生することによりリポソーム自体の凝集も抑制することができる。加えてエーテル鎖は、他の脂質の親水性部と直接あるいは、水分子等を介して水素結合することによりリポソーム内包からの内包物のもれを抑制する。

また式ノで表わされる化合物の主環部を占めるポリエチレングリコール部は、人工脂質の欠点である主体内毒性という観点でも無害であることがすでに多くの動物実験で確かめられている(日本特

化学治療雑誌、11巻、2227頁、1984年)。上記の観点においても本発明の効果は大きいのである。

実施例1.

卵黄レシチン30mg、例示化合物2(10mg)、コレステロール(1.4mg)をクロロホルム(3ml)に溶解し減圧留去して薄膜を作つた。十分に乾燥後カルボキシフルオレセインのBuffer溶液(200mM; Tris-HCl Buffer pH=8.6; 200mM NaCl含有)3mlを加えて15分間ボルテックスを行いその後プローブ型の超音波発生装置で10分間ソニケーションを行った。Sephacrose 4Bでゲル化後、各フラクションについて平均粒径、リン脂質濃度を測定した。

次に30°CのTris-HCl Buffer液中(pH=8.6)で、カルボキシフルオレセインの漏出をけい光測定で追跡した。その結果を第1図に示した。第1図において縦軸は漏出したカルボキシフルオレセインのわりあいを示し、横軸は

時間を示す。第1図において線①は卵黄レシチンのみを用いて作つたリポソーム、線②は卵黄レシチンとコレステロールを3:1の割合で用いて作つたリポソーム、線③は本実施例のリポソームを示す。①、②、③ともに平均粒径0.28μmのフラクションを用いて測定したものである。第1図から本発明の化合物を用いることにより、リポソーム内容物の漏出が少なくなることがわかる。

本発明の化合物の種類や量を変えても同様の傾向が得られた。

4. 図面の簡単な説明

第1図は3種のリポソームからの内容物(カルボキシフルオレセイン)の漏出度の時間変化を示したグラフである。

線①は卵黄レシチンのみを用いたリポソーム、

線②は卵黄レシチンとコレステロールを3:1の割合で用いて作成したリポソーム、

線③は実施例1のリポソーム、

を表す。

特許出願人 富士写真フイルム株式会社

手続補正書

昭和63年9月19日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示 昭和63年特願第76862号

2. 発明の名称 リポソームの製造方法

3. 補正をする者

事件との関係

特許出願人

住 所 神奈川県南足柄市中沼210番地

名 称(520)富士写真フイルム株式会社

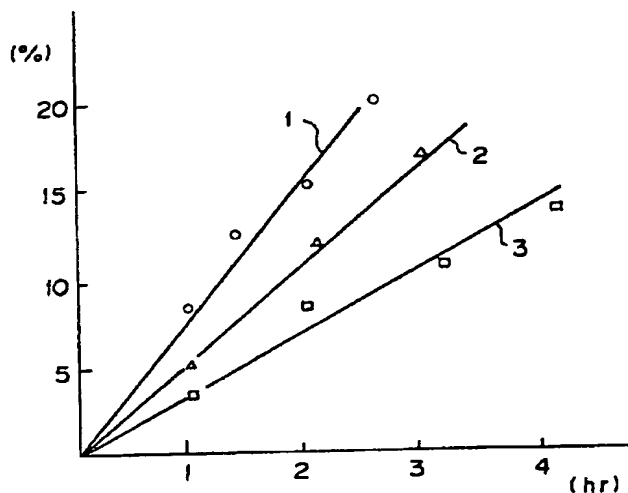
代表者 大 西 寛

連絡先 〒106 東京都港区西麻布2丁目26番30号

富士写真フイルム株式会社 東京本社
電話(406) 2537

方式 (11/19)

第 1 図



4. 補正の対象 明細書の「発明の詳細な説明」
の欄

5. 補正の内容

明細書の「発明の詳細な説明」の項の記載を下
記の通り補正する。

- 1) 第3頁/0行目の
「ポリソーム膜」を
「リポソーム膜」

と補正する。

- 2) 第4頁/行目の
「カンベステロール」を
「エルゴステロール」

と補正する。

以 上